N° 48. **Cesi Mondadori** und **Rüdiger Wehner.** — Interferenz- und polarisationsmikroskopische Untersuchungen an der Cornea von *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera)[1].

(Mit 2 Textabbildungen)

Zoologisches Institut der Universität Zürich.

Seit EXNER (1891) mit Hilfe eines Mikrorefraktometers Brechzahlen im dioptrischen Apparat von Arthropoden ermittelte, wurden verschiedene Methoden angewendet, um Brechungsindices zu bestimmen. SEITZ (1968, 1969) konnte durch Verwendung eines Zweistrahlen-Interferenzmikroskops genauere Aussagen über Brechzahlen in Ommatidien von *Calliphora erythrocephala* sowie bei *Phausis splendidula* machen. Diese Methode wurde von VARELA und WIITANEN (1970) modifiziert und bei *Apis mellifera* angewendet. Der von EXNER (1891) postulierte Linsenzylinder mit grösster Brechzahl in der optischen Achse konnte bei *Phausis* gefunden werden, nicht aber bei *Apis* und *Calliphora*. Die Cornea von *Phausis* erwies sich als optisch homogen; bei *Apis* und *Calliphora* nimmt die Brechzahl von distal nach proximal ab.

Auf der Suche nach dem Polarisationsanalysator in Facettenaugen wurden verschiedene Theorien über die polarisationsoptischen Eigenschaften der Insektencornea aufgestellt, ohne dass sie experimentell gesichert werden konnten (BAYLOR und SMITH, 1953; STEPHENS, FINGERMANN und BROWN, 1953). Die erste Arbeit über polarisationsoptisches Verhalten der Insektencornea stammt von STOCKHAMMER (1956), der die Cornea einiger ausgewählter Dipteren und Hymenopteren untersuchte. In Schnitten parallel zur optischen Achse des Ommatidiums erwies sich die Cornea als anisotrop, verhielt sich in Schnitten senkrecht zur Ommatidienachse dagegen optisch neutral. Ameisen wurden in der betreffenden Arbeit nicht untersucht.

MATERIAL UND METHODE

Als Versuchsmaterial dienten die Komplexaugen der Arbeiterinnen von *Cataglyphis bicolor*. Die Tiere stammten aus Südtunesien (Maharès, 34° 31′ N, 10° 21′ E) und wurden seit dem 6.9.70 in Gipsnestern im Labor gehalten. Die Messungen erfolgten im Zeitraum Oktober 1970 bis April 1971. Die Augen

[1] Mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Kredit Nr. 3.315.70.

wurden mit einem Irisskalpell ausgeschnitten, bei $-28°$ bis $-25°$ C in Aqua dest. eingefroren und mit einem Gefrierschnittmikrotom bei $-15°$ bis $-12°$ C geschnitten. Die Schnitte kamen dann in Aqua dest. auf einem Objektträger unter dem Interferenzmikroskop zur Beobachtung. Um das Verdampfen des Wassers zu verhindern, wurden die Deckgläser mit 38° Paraffin luftdicht umrandet.

Für die interferenzmikroskopische Untersuchung stand ein Zweistrahlen-Interferenzmikroskop der Firma Leitz, Mach-Zehnder Typ, zur Verfügung. Die Gangunterschiede wurden mit einem Keilkompensator gemessen .

Die interferenzmikroskopische Messung gibt Aufschluss über die Phasendifferenz zweier kohärenter Lichtwellen, nachdem sich die eine im Einbettungsmedium, die andere durch das Objekt hindurch fortgepflanzt hat. Die Differenz der von den beiden Lichtwellen zurückgelegten Wege wird als Gangunterschied G bezeichnet. Er manifestiert sich im Streifenfeld als eine einfache Verschiebung des Streifenmusters, deren Grösse mit einem Kompensator gemessen werden kann. Aus dem Gangunterschied ergibt sich der Brechungsindex n nach folgender Formel:

$$n_{obj} = \frac{G}{d} + n_{med},$$

wobei n_{obj} der gesuchte Brechungsindex, n_{med} der Brechungsindex des Bezugsmediums (Wasser: 1,3347) und d die Schnittdicke ist. Alle Messungen wurden bei einer Lichtwellenlänge von 546 *nm* durchgeführt.

Die polarisationsoptischen Untersuchungen erfolgten mit einem Polarisationsmikroskop der Firma Leitz, Typ Biopol. Zur Untersuchung gelangten Gefrierschnitte von 10 μm Dicke sowie in Durcupan eingebettete Glasmesserschnitte von 4—5 μm Dicke.

Ergebnisse

a) *Brechungsindices*

Nur an 29 von insgesamt 1342 Präparaten war eine messtechnisch einwandfreie Feststellung der Brechzahl möglich. Als Kriterium für die Messbarkeit wurde ein absolut klar erkennbarer Interferenz-Messstreifen durch das ganze Objekt angenommen. Der gefundene Brechungsindex der am weitesten distalen Cornearegion liegt bei 1,490 ± 0,003, steigt in mittleren Bereich auf ein Maximum von 1,535 ± 0,005 an und nimmt gegen die Grenze zum Corneazapfen wieder auf 1,501 ± 0.004 ab. Das Ansteigen des Brechungsindex in der Corneamitte konnte statistisch nach dem t-Test gesichert werden ($p < 0{,}001$). Der Verlauf der Interferenzstreifen kann in Abbildung 1 verfolgt werden, in der der Messstreifen mit Pfeilen markiert ist.

Um ausser der Cornea noch andere Augenteile im Schnitt zu erhalten, wurden

verschiedene Versuche unternommen: Variation der Einfriertemperatur und de -mediums, Variation der Schnittemperatur. Keine dieser Methoden liefert befriedigende Resultate. Als ebenso unmöglich erwies es sich, örtlich genau definierbare Querschnitte der Cornearegion zu erhalten, da die Schnittdicke nu unwesentlich unter dem Durchmesser der Cornea von 16 µm (WEHNER, EHEI und HERRLING, 1971) liegt. Die Messung der wenigen nicht abgerissenen Cornea

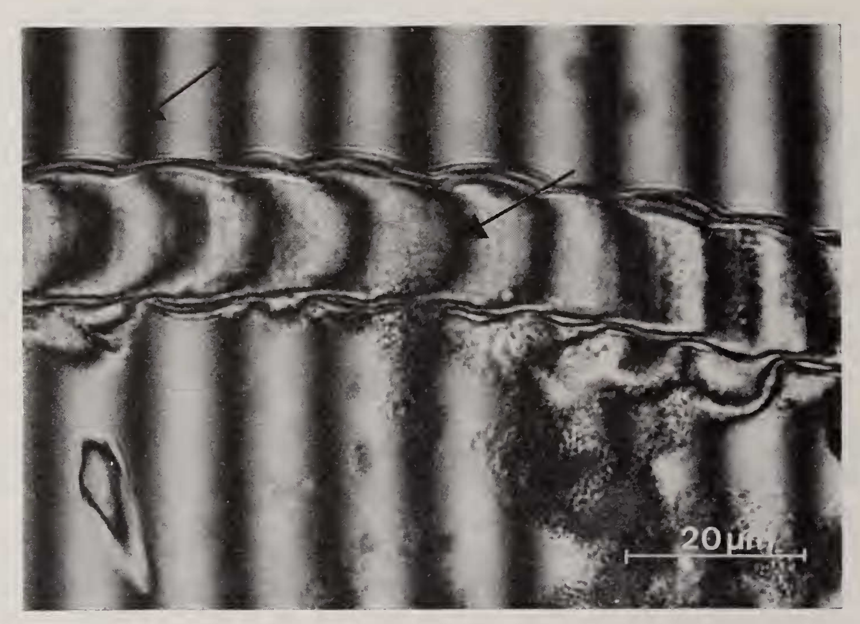


ABB. 1.

Cornea im Streifenfeld bei 546 nm Wellenlänge. Schnittrichtung parallel zur optischen Achs der Ommatidien. Der Messstreifen ist durch Pfeile markiert. Der nicht parallele Verlauf de Streifen im Objekt ist durch Abweichungen von der idealen Schnittdicke bedingt.

zapfen scheiterte an deren halbkugelförmigen Gestalt, die bei einem Durchmesse von 14 µm und einer minimalen Schnittdicke von 10 µm keine genaue Kontroll des Schnittverlaufs ermöglicht.

b) *Polarisationsoptische Befunde*

Die Cornea zeigt an Schnitten parallel zur Ommatidienachse in den ver- wendeten Medien (Brechungsindices 1,33—1,52) Doppelbrechungserscheinunge (Abb. 2). Sehr deutlich wird dabei der geschichtete Aufbau der Cornea sichtbar Die Lamellen durchziehen die Cornea des gesamten Auges und werden an de Grenzen zwischen den einzelnen Ommatidien nicht unterbrochen, sondern nu eingedellt, was zur Bildung von Corneazapfen führt. Diese Zapfen unterscheide sich aber vom distalen durchgehenden Teil der Cornea durch unterschiedlich

Färbbarkeit mit Methylen- und Toluidinblau (BRUNNERT und WEHNER, im Druck). Ausserdem lässt die polarisationsoptische Auslöschfigur in Orthogonallage (ein Auslöschungsbalken) vermuten, dass die Zapfen als plankonvexe oder konvexkonkave Linse eine optische Untereinheit bilden. Bei Verwendung eines Gipsplättchens 1. Ordnung zeigte sich bei Durcupanpräparaten, dass die distalste

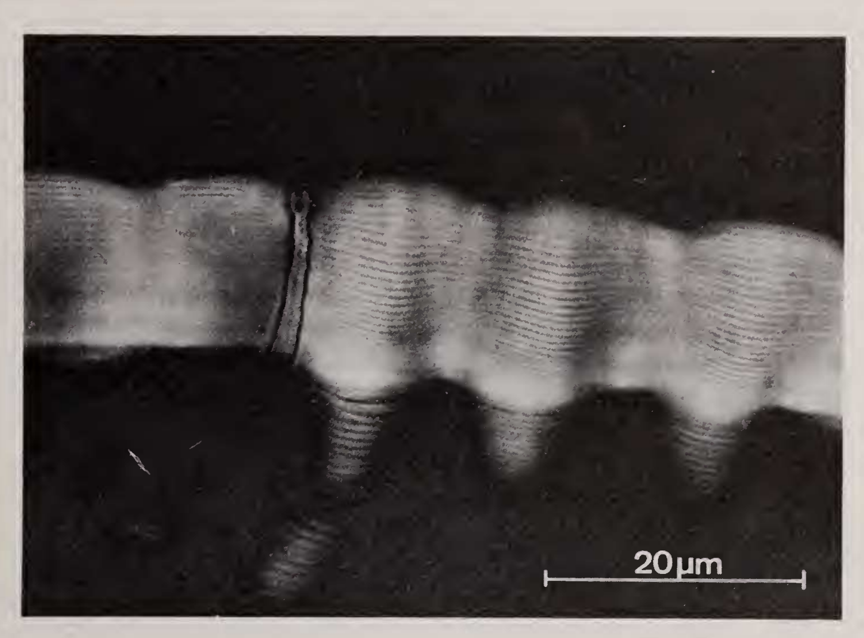


ABB. 2.

Cornea bei gekreuzten Polars. Schnittrichtung parallel zur optischen Achse des Ommatidiums. Beim Corneazapfen ist nur ein zentraler aufleuchtender Balken sichtbar.

Region der Cornea (eine oder zwei Schichten) ein umgekehrtes Vorzeichen bezüglich der Doppelbrechung aufweist.

Schnitte senkrecht zur Ommatidienachse verhalten sich ebenso wie der Kristallkegel isotrop.

DISKUSSION

a) *Brechungsindices*

Die lineare Beziehung $G = d(n_{obj} - n_{med})$ zeigt, dass der mit dem Kompensator gemessene Gangunterschied und somit auch der daraus berechnete Brechungsindex von der Schnittdicke d abhängen. Bei Gefrierschnitten muss mit einer Abweichung von $\pm$ 10% gegenüber der am Mikrotom eingestellten Schnittdicke gerechnet werden. Durch Verwendung von mindestens zwei ver-

schiedenen Einschlussmitteln kann die Schnittdicke d aus den Gleichungen eliminiert werden; doch müssen diese Einbettungsmittel eine Reihe von Bedingungen erfüllen (MÜLLER 1968):

1. Sie müssen gegenüber dem Objekt chemisch inert sein.
2. Sie dürfen die Gesamtmasse des Objektes nicht verändern.
3. Sie dürfen keine Konzentrationsänderungen im Objekt verursachen, z.B. Schrumpfung oder Quellung.
4. Sie müssen gleichmässig und vollständig in das Objekt eindringen.
5. Sie dürfen den Brechungsindex des Objektes nicht beeinflussen.

Falls diese Bedingungen erfüllt sind, kann man den Gangunterschied des Objektes in Abhängigkeit vom Brechungsindex der Einschlussmittel graphisch darstellen, wobei im Idealfall eine Gerade entsteht, an deren Schnittpunkt mit der Achse, auf der die Brechungsindices der Einbettungsmittel abgetragen sind, der gesuchte Brechungsindex abgelesen werden kann. Da SEITZ (1968) sowie VARELA und WIITANEN (1970) nur ein bzw. zwei Einbettungsmittel angeben, sind die dort genannten Brechzahlen mit gewissen Unsicherheitsfaktoren behaftet.

Weitere Unsicherheitsfaktoren sind durch die chemisch heterogene Zusammensetzung des Facettenauges bedingt. Alle Augenteile sind beim Einfrieren und Auftauen erheblichen Einflüssen ausgesetzt, weshalb es unerlässlich ist, das Ausmass der dadurch hervorgerufenen Veränderungen abzuschätzen. Ausserdem ist zu vermuten, dass verschiedene Augenteile verschieden beeinflusst werden und somit die Brechzahlen auch in ihrer gegenseitigen Relation Verschiebungen ausgesetzt sind.

Damit stellt sich die Frage nach der Genauigkeit der hier aufgeführten Werte. Zwar wurde trotz der genannten Unsicherheitsfaktoren die von SEITZ (1968) eingeführte Methode übernommen; da aber ausschliesslich Corneamaterial untersucht und jede Messung im Streifenfeld vorgenommen wurde, dürften sich die erwähnten Unsicherheitsfaktoren nur unerheblich auswirken.

Bei den Augen von *Cataglyphis bicolor* handelt es sich im Vergleich zu den Augen von *Apis mellifera* und *Calliphora erythrocephala* um ausserordentlich kleine Objekte. Interferometrisch liessen sich zwar noch kleinere Objekte messen. Die limitierende Grösse stellt die minimale Schnittdicke von 10 μm dar, die einerseits keine örtlich exakt bestimmbaren Schnitte durch einzelne kleine Augenteile mehr erlaubt und durch die andererseits nicht-chitinöse Augenstrukturen durchwegs zerstört werden. Corneadurchmesser (16 μm) und Corneazapfendurchmesser (14 μm) bewegen sich grössenordnungsmässig im Bereich der minimalen Schnittdicke des Mikrotoms, wobei noch mit einer mittleren Abweichung von $\pm$ 1 μm (bei $d = 10$ μm) von der eingestellten Schnittdicke zu rechnen ist.

Wegen der Härte der Cornea, die im gefrorenen Zustand leicht splittert, konnte nur parallel zur optischen Achse der Ommatidien geschnitten werden. Es erhebt sich dabei die Frage, ob es sich bei dem erwähnten Ansteigen des Brechungsindex in der mittleren Cornearegion um einen Schneideeffekt handeln könnte. Doch würde diese Interpretation eine Abweichung von über 20% von der eingestellten Schnittdicke bedingen, was nicht anzunehmen ist. Die von Seitz (1968) für die Cornea von *Calliphora* gefundenen Brechzahlen betragen von distal nach proximal 1.473, 1.453, 1.415. Der Brechungsindex der Cornea von *Phausis* beträgt 1.520 (Seitz 1969). Varela und Wiitanen (1970) fanden für *Apis* 1.490, 1.452, 1.435.

Die Werte für *Apis* und *Calliphora* entsprechen sich; *Phausis* nimmt eine Sonderstellung ein. Die Brechzahl von 1.520 entspricht grössenordnungsmässig den gefundenen Werten für *Cataglyphis*; doch handelt es sich bei *Cataglyphis* um ein anderes optisches System.

Vorstellungen über die genauen Eigenschaften eines solchen optischen Systems lassen sich wegen der genannten Fehlerquellen aus den Brechzahlen allein nicht gewinnen. Dazu sind direkte Strahlengangsmessungen erforderlich.

b) *Polarisationsoptische Befunde*

Aus den polarisationsmikroskopischen Ergebnissen geht hervor, dass parallel zu der optischen Achse des Ommatidiums einfallende Strahlen nicht beeinflusst werden. Schräg einfallende polarisierte Strahlen pflanzen sich entweder mit der Geschwindigkeit des ordentlichen oder ausserordentlichen Strahls in der Cornea fort (falls die Schwingungsrichtung des einfallenden Lichts parallel zu einer Schwingungsebene in der Cornea liegt) oder werden in zwei linear polarisierte Komponenten zerlegt (falls die Schwingungsrichtung zu keiner der beiden Schwingungsebenen in der Cornea parallel liegt) (Stockhammer 1956). Genauen Aufschluss könnten Versuche mit einem Polarisationsmikroskop mit beweglicher Lichtquelle und Messeinrichtung ergeben. Es ist zu vermuten, dass für schräg einfallende Strahlen aufgrund der vorliegenden Resultate (Brechzahlen, polarisationsoptische Befunde) zwei Möglichkeiten bestehen:

1. Ablenkung und anschliessende Absorbtion durch das Pigment.

2. Ablenkung und Weiterleitung zum Rhabdom.

Seitz (1969) schliesst nicht aus, dass Lichtstrahlen den dioptrischen Apparat nach mehrfacher Totalreflexion wieder durch die Cornea verlassen können.

Zusammenfassung

1. Mit Hilfe des Interferenzmikroskops werden Brechzahlen in Längsschnitten durch die Cornea von *Cataglyphis bicolor* bestimmt. Im distalen Teil der Cornea beträgt der Brechungsindex 1,490 ± 0,003, steigt in der Mitte auf ein Maximum von 1,535 ± 0,005 und sinkt im proximalen Teil wieder auf 1,501 ± 0,004. Die Genauigkeit der gefundenen Resultate sowie allgemeine methodische Probleme werden diskutiert.
2. Unter Verwendung eines Polarisationsmikroskops wird die Cornea auf polarisationsoptische Eigenschaften untersucht. In Schnitten parallel zur optischen Achse verhält sie sich anisotrop, in Schnitten senkrecht zur optischen Achse isotrop. Ein lamellierter Aufbau der Cornea wird sichtbar; die Corneazapfen werden als Folge von Eindellungen der Cornea an den Ommatidiengrenzen erkannt. Der Einfluss eines solchen optischen Systems auf einfallendes polarisiertes Licht wird diskutiert.

Summary

1. Using an interference microscope one can determine the indices of refraction in longitudinal sections through the cornea of *Cataglyphis bicolor*. The refractive index is 1,490 ± 0,003 in the distal part of the cornea, reaches a maximum of 1,535 ± 0,005 in the middle and decreases to 1,501 ± 0,004 in the proximal part. The reliability of the results as well as general methodical problems are discussed.
2. The polarisation microscope allows the examination of the optical qualities in respect to polarisation in the cornea. In longitudinal sections the cornea has anisotropic qualities, in cross sections it is isotropic. The laminated structure of the cornea is demonstrated; as part of the dioptric apparatus it protrudes into a respective cavity in the crystalline cone and is not interrupted between neighbouring ommatidia. The optical capacities of such a system in transmitting polarized light is the subject of discussion.

Résumé

1. L'index de réfraction de la cornée de *Cataglyphis bicolor* a été déterminé sur des coupes longitudinales à l'aide d'un microscope d'interférence. Dans la partie distale il a une valeur de 1,490 ± 0,003, augmentée au milieu jusqu'à 1,535 ± 0,005 et diminuée à 1,501 ± 0,004 dans la partie proximale. Nous discutons l'exactitude des résultats ainsi que quelques aspects méthodiques.

2. Les qualités dichroiques de la cornée sont examinées au microscope de polarisation. La cornée coupée parallèlement à l'axe optique des ommatidies est anisotrope, perpendiculairement à celui-ci elle est isotrope. On constate une structure lamellaire de la cornée. Les limites des ommatidies sont caractérisées au niveau des projections sphériques proximales de la cornée par des indentations profondes. Nous discutons les effets du système optique cornéen mentionnés plus haut sur la lumière polarisée incidente.

LITERATUR

BAYLOR, E. R. and F. E. SMITH. 1953. *The orientation of cladocera to polarized light.* Amer. Nat. 87: 97-101.

EXNER, S. 1891. *Die Physiologie der fazettierten Augen von Krebsen und Insekten.* Leipzig und Wien, Franz Deuticke.

GAHM, J. 1962. *Durchlicht-Interferenzeinrichtungen nach Jamin-Lebedeff.* Zeiss-Mitt. 2: 389-410.

— 1963. *Quantitative Messungen mit der Interferenzanordnung von Jamin-Lebedeff.* Zeiss-Mitt. 3: 3-31.

— 1964. *Quantitative polarisationsoptische Messungen mit Kompensatoren.* Zeiss-Mitt. 3: 153-192.

HANNES, H. 1969. *Messung kleiner Brechzahlunterschiede.* Leitz-Mitt. Wiss. u.Techn. 5: 25-32.

MENZEL, R., K. MOCH, G. WLADARZ und M. LINDAUER. 1969. *Tagesperiodische Ablagerungen in der Endocuticula der Honigbiene.* Biol. Zbl. 88: 61-67.

MÜLLER, W. 1968. *Untersuchungen zur interferenzmikroskopischen Massenbestimmung an inhomogenen Objekten.* Diss. ETH Zürich.

SCHMIDT, W. J. 1939. *Über den polarisationsoptischen Nachweis des Chitins bei Tieren und Pflanzen.* Z. wiss. Mikrosk. 56: 24-51.

SEITZ, G. 1968. *Der Strahlengang im Appositionsauge von Calliphora erythrocephala (Meig).* Z. vergl. Physiol. 59: 205-231.

— 1969. *Untersuchungen am dioptrischen Apparat des Leuchtkäferauges.* Z. vergl. Physiol. 62: 61-74.

— 1971. *Bau und Funktion des Komplexauges der Schmeissfliege.* Naturwiss. 5: 258-265.

STEPHENS, G. C., M. FINGERMAN and F. A. BROWN. 1953. *The orientation of Drosophila to plane polarized light.* Ann. Entomol. Soc. Amer. 46: 75-83.

STOCKHAMMER, K. 1956. *Zur Wahrnehmung der Schwingungsrichtung linear polarisierten Lichtes bei Insekten.* Z. vergl. Physiol. 38: 30-83.

— und G. MENZER. 1951. *Zur Polarisationsoptik der Fazettenaugen.* Naturwiss. 38: 190-191.

VARELA, F. G. and W. WIITANEN. 1970. *The optics of the compound eye of the honeybee (Apis mellifera).* J. gen. Physiol. 55: 336-358.

WEHNER, R., W. P. EHEIM und P. L. HERRLING. 1971. *Die Rastereigenschaften des Komplexauges von Cataglyphis bicolor (Formicidae, Hymenoptera).* Rev. Suisse Zool. 78: 722-737.